

Cara uji mikrobiologi - Bagian 3: Penentuan Angka Lempeng Total (ALT) pada produk perikanan





© BSN 2015

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip.....	2
4 Peralatan	2
5 Media dan pereaksi	2
6 Kondisi	2
7 Preparasi contoh.....	2
8 Prosedur	3
9 Pembacaan dan perhitungan koloni pada cawan petri.....	4
10 Pelaporan	5
11 Keamanan dan keselamatan kerja	6
Lampiran A (normatif) Pembuatan media	8
Lampiran B (normatif) Pembuatan pereaksi	9
Lampiran C (informatif) Skema penentuan Angka Lempeng Total (ALT).....	10
Lampiran D (informatif) Skema penentuan Angka Lempeng Total anaerob (ALT anaerob) .	11
Bibliografi	12
 Tabel 1 - Berat contoh yang diambil yang akan diuji	 3
Gambar C.1 - Skema penentuan Angka Lempeng Total (ALT).....	10
Gambar D.1 - Skema penentuan Angka Lempeng Total anaerob (ALT anaerob)	11

Prakata

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan terhadap komoditas produk perikanan yang akan dipasarkan di dalam dan luar negeri, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang metode uji yang dapat memenuhi jaminan tersebut.

Standar ini merupakan revisi dari:

SNI 01-2332.3-2006, *Cara uji mikrobiologi - Bagian 3: Penentuan Angka Lempeng Total (ALT) pada produk perikanan*

Bagian yang direvisi adalah penambahan lampiran D (informatif) Skema penentuan angka lempeng total (ALT) *anaerob* pada daftar isi, perubahan aturan-aturan dalam prakata, penambahan kondisi *anaerob* dalam istilah dan definisi, penghapusan salah satu prinsip metode cawan agar sebar dan penghapusan metode cawan agar sebar pada prosedur, penghapusan batang gelas bengkok pada peralatan yang digunakan, penambahan media dan pereaksi untuk ALT *anaerob*, perubahan preparasi contoh dalam bentuk tabel, penambahan tahapan uji untuk ALT *anaerob*, penambahan pembuatan media untuk uji ALT *anaerob* pada lampiran A (normatif), penambahan skema dalam penentuan ALT *anaerob* pada lampiran D (informatif), perubahan pada bibliografi.

SNI ini disusun oleh Komite Teknis 65-05: Produk Perikanan yang dirumuskan melalui rapat teknis dan rapat konsensus pada tanggal 21 Oktober 2014 di Jakarta dihadiri oleh anggota Komite Teknis 65-05: Produk Perikanan sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Berkaitan dengan penyusunan Standar Nasional Indonesia ini, maka aturan yang dijadikan dasar atau pedoman adalah Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.019/MEN/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 15 Januari 2015 sampai dengan 16 Maret 2015 dengan hasil akhir RASNI.

Cara uji mikrobiologi - Bagian 3: Penentuan Angka Lempeng Total (ALT) pada produk perikanan

1 Ruang lingkup

Metode penentuan angka lempeng total ini digunakan untuk menentukan jumlah total mikroorganisma aerob dan anaerob pada produk perikanan.

2 Istilah dan definisi

2.1

angka lempeng total aerob

jumlah mikroorganisma hidup yang membutuhkan oksigen yang terdapat dalam suatu produk yang diuji

2.2

angka lempeng total anaerob

jumlah organisme yang dapat hidup tanpa oksigen

2.3

inkubasi

pengkondisian mikroorganisma untuk tumbuh dan berkembang biak sesuai dengan suhu dan waktu yang diperlukan

2.4

kondisi anaerob

kondisi tanpa oksigen

2.5

koloni

sel mikroba yang tumbuh pada media agar dan dapat dilihat secara visual

2.6

media agar

media padat yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme

2.7

produk perikanan

ikan termasuk biota perairan lainnya yang ditangani dan/atau diolah untuk dijadikan produk akhir yang berupa ikan segar, ikan beku dan olahan lainnya yang digunakan untuk konsumsi manusia

2.8

mesofilik

kelompok mikroorganisme yang hidup pada suhu 20 °C – 40 °C dengan suhu optimum 35 °C

2.9

termofilik

kelompok mikroorganisme yang hidup pada suhu 45 °C – 65 °C dengan suhu optimum 55 °C

3 Prinsip

Mikroorganisme ditumbuhkan dengan metode agar tuang, diinkubasikan dalam kondisi aerob atau anaerob pada suhu dan waktu yang sesuai hingga tumbuh dan berkembang biak dengan membentuk koloni yang dapat dihitung.

4 Peralatan

- alat penghitung koloni,
- *anaerobic jar*,
- *autoclave*,
- blender beserta jar yang dapat disterilisasi atau *stomacher*,
- botol pengencer 20 mL,
- cawan petri 15 mm x 90 mm,
- inkubator $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- inkubator $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- pipet gelas atau pipetor: 0,1 mL, 1 mL, 5 mL, dan 10 mL,
- timbangan dengan ketelitian 0,0001 g,
- *waterbath* sirkulasi suhu $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5 Media dan pereaksi

- *bacto agar*,
- *fluid thioglycolate medium*,
- *gas pack* dan *anaerobic indicator strips*,
- larutan *butterfield's phosphate buffered*,
- *mineral oil*,
- *nutrient agar*,
- *peptone water*,
- *plate count agar*,
- *tryptic soy agar*.

6 Kondisi

Pada metode cawan agar tuang, untuk menghindari berkurangnya populasi bakteri akibat panas yang berlebihan maka media agar diletakkan terlebih dahulu pada *waterbath* yang akan dituang mempunyai suhu $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ sebelum digunakan.

Proses penuangan media agar dilakukan dalam waktu maksimal 15 menit setelah pengenceran awal.

7 Preparasi contoh

Dengan menerapkan teknis aseptis, contoh diambil secara acak dan dipotong kecil-kecil hingga berat masing-masing contoh yang akan diuji sesuai ketentuan pada Tabel 1.

Contoh beku dilelehkan pada saat akan dianalisa dan pelelehan dilakukan selama 18 jam pada suhu sekitar $2\text{ }^{\circ}\text{C} - 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ atau suhu di bawah $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan tidak lebih dari 15 menit.

Tabel 1 - Berat contoh yang diambil yang akan diuji

Berat contoh	Berat contoh yang akan diuji
< 1 kg atau 1 L	100 g atau 100 mL
1 kg atau 1 L – 4,5 kg atau 4,5 L	300 g atau 300 mL
> 4,5 kg atau 4,5 L	500 atau 500 mL

8 Prosedur

8.1 Persiapan pengujian

- Untuk contoh dengan berat lebih kecil atau sama dengan 1 kg atau 1 L sampai dengan 4,5 kg atau 4,5 L timbang contoh padat sebanyak 25 g atau contoh cair sebanyak 25 mL dari contoh yang akan diuji, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 225 mL Larutan *Butterfield's Phosphate Buffered*.
- Untuk contoh dengan berat lebih besar dari 4,5 kg atau 4,5 L timbang contoh padat sebanyak 50 g atau contoh cair sebanyak 50 mL, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 450 mL Larutan *Butterfield's Phosphate Buffered*.
- Homogenkan selama 2 menit. Homogenat ini merupakan larutan dengan pengenceran 10^{-1} .
- Dengan menggunakan pipet steril, ambil 10 mL homogenat diatas dan masukkan ke dalam 90 mL Larutan *Butterfield's Phosphate Buffered* untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} .
- Siapkan pengenceran selanjutnya (10^{-3}) dengan mengambil 10 mL contoh dari pengenceran 10^{-2} ke dalam 90 mL Larutan *Butterfield's Phosphate Buffered*.
- Pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan minimal 25 kali.
- Selanjutnya lakukan hal yang sama untuk pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} dst sesuai dengan kondisi contoh.

8.2 Tahapan pengujian

8.2.1 ALT aerob

- Pipet 1 mL dari setiap pengenceran diatas dan masukkan ke dalam cawan petri steril. Lakukan secara duplo untuk setiap pengenceran.
- Tambahkan 12 mL - 15 mL PCA ke dalam masing-masing cawan yang sudah berisi contoh. Supaya contoh dan media PCA tercampur sempurna, lakukan pemutaran cawan ke depan-ke belakang dan ke kiri-ke kanan.
- Inkubasi cawan-cawan tersebut dalam posisi terbalik. Masukkan ke dalam inkubator pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ untuk bakteri mesofilik atau pada suhu $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ untuk bakteri termofilik selama $48\text{ jam} \pm 2\text{ jam}$.

8.2.1 ALT anaerob

- Tuang 6 mL - 7 mL media (PCA/NA/TSA) ke dalam cawan petri steril, sebarkan dengan cepat dan ratakan.
- Pada saat media agar telah membeku, pipet secara aseptik 1 mL contoh yang telah homogen dari masing-masing pengenceran pada bagian tengah cawan petri. Lakukan secara duplo.
- Tuangkan 15 mL *Thioglycolate agar* ke dalam cawan petri. Campur dengan baik dan putar dengan hati-hati.

- d) Inkubasi cawan-cawan tersebut dalam posisi tidak terbalik dalam *anaerobic jar* dan masukkan kedalam inkubator pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ untuk bakteri mesofilik atau $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ untuk bakteri termofilik selama $48\text{ jam} \pm 2\text{ jam}$.

9 Pembacaan dan perhitungan koloni pada cawan petri

9.1 Cawan yang mengandung jumlah 25 koloni – 250 koloni dan bebas *spreader*

Catat pengenceran yang digunakan dan hitung jumlah total koloni. Perhitungan ALT sebagai berikut:

Catat pengenceran yang digunakan dan hitung jumlah total koloni. Perhitungan ALT sebagai berikut:

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0.1 \times n_2)] \times (d)}$$

Keterangan:

- N jumlah koloni produk, dinyatakan dalam koloni per mL atau koloni per g;
 $\sum C$ jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung;
 n_1 jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung;
 d pengenceran pertama yang dihitung.

CONTOH:

Pengenceran	1:100	1:1000
Jumlah koloni	232 dan 244	33 dan 28

$$\begin{array}{r}
 N \\
 \hline
 \frac{(232 + 244 + 33 + 28)}{[(1 \times 2) + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} \\
 \hline
 537 \\
 \hline
 0,022 \\
 \hline
 24.400 \\
 \hline
 24.000
 \end{array}$$

9.2 Cawan dengan jumlah koloni lebih besar dari 250 koloni

Bila jumlah koloni per cawan lebih besar dari 250 koloni pada seluruh pengenceran maka laporkan hasilnya sebagai terlalu banyak untuk dihitung (TBUD), tetapi jika salah satu pengenceran mempunyai jumlah koloni mendekati 250 koloni laporkan sebagai perkiraan ALT.

CONTOH:

Pengenceran	:	1 : 100	1 : 1000
Jumlah koloni	:	TBUD	640
Perkiraan ALT koloni per mL atau per g	:	640.000	

9.3 Spreader

Koloni *spreader* dibedakan menjadi 3 tipe:

- Rantai koloni, antara koloni saling menyambung yang disebabkan karena bakteri yang saling mengelompok.
- Spreader* berasal dari lapisan air antara agar dan dasar cawan.
- Spreader* berasal dari lapisan air pada sisi/pinggir cawan atau pada permukaan agar. Jika cawan ditumbuhi *spreader* lebih besar dari 25% maka laporkan sebagai *spreader*.
 - Spreader* tipe 1, jika hanya ada 1 rantai maka nyatakan sebagai 1 koloni.
 - Jika 1 atau lebih rantai terlihat berasal dari sumber yang berbeda, laporkan masing-masing sumber sebagai 1 koloni.
 - Spreader* tipe 2 dan 3 umumnya berasal dari koloni yang berbeda dan laporkan masing-masing sebagai 1 koloni.
- Jumlahkan *spreader* dan koloni untuk menghitung "**Angka Lempeng Total**".

9.4 Jumlah koloni semua cawan kurang dari 25 koloni atau cawan tanpa koloni.

Bila pada kedua pengenceran yang digunakan diperoleh koloni kurang dari 25 koloni, catat koloni yang ada, tetapi nyatakan perhitungan sebagai kurang dari 25 koloni dan dikalikan dengan 1/d, dimana d adalah faktor pengenceran pertama yang digunakan dan dilaporkan sebagai perkiraan ALT.

CONTOH:

Pengenceran	:	1:100	1:1000
Jumlah koloni	:	18 dan 0	2 dan 0
Perkiraan ALT koloni per mL atau koloni per g	:	< 2.500	< 2.500

10 Pelaporan

- Untuk menghasilkan perhitungan yang akurat dan teliti, maka laporkan hasilnya dengan dua angka (digit) pertama sebagai hasil pembulatan.
- Bulatkan keatas dengan cara menaikkan angka kedua menjadi angka yang lebih tinggi bila angka ketiga adalah 6, 7, 8 atau 9 dan gunakan angka 0 untuk masing-masing angka pada digit berikutnya.
- Bulatkan ke bawah bila angka ketiga adalah 1, 2, 3 atau 4. Bila angka ketiga 5, bulatkan keatas bila angka kedua ganjil dan bulatkan kebawah bila angka kedua genap.

CONTOH:

Hasil perhitungan	ALT
12.700	13.000
12.400	12.000
15.500	16.000
14.500	14.000

- Beri tanda bintang (*) untuk cawan yang kurang dari 25 koloni.

CONTOH:

Pengenceran	:	1:100	1:1000
Jumlah koloni	:	18 dan 0	2 dan 0
Perkiraan ALT koloni per ml atau koloni per g	:	< 2.500*	< 2.500*

- Jika seluruh cawan berisi *spreader* atau cawan terkontaminasi oleh sesuatu yang tidak diketahui, maka laporkan hasil sebagai 'Kegagalan dalam pengujian'

Contoh perhitungan:

1. Cawan dengan jumlah koloni 25 koloni – 250 koloni

Perhitungan Angka Lempeng Total sebagai berikut:

$$\frac{\sum C}{N}$$

$$N = [(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (d)$$

Keterangan:

- N adalah jumlah koloni produk, dinyatakan dalam koloni per mL atau koloni per g;
 $\sum C$ adalah jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung;
 n_1 adalah jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 adalah jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung;
 d adalah pengenceran pertama yang digunakan

CONTOH:

Pengenceran	:	1:1000	1:1000
Jumlah koloni	:	33 dan 28	33 dan 28

$$N = \frac{(232 + 244 + 33 + 28)}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2)]10^{-2}}$$

$$= 537 / 0,022$$

$$= 24.409$$

$$= 24.000$$

2. Seluruh cawan berisi *spreader* dan atau kegagalan dalam pengujian. Laporkan hasil sebagai "*Spreader*" (SPR) atau kegagalan dalam pengujian
3. Seluruh cawan berisi lebih dari 100 koloni/cm². Perkiraan jumlah ALT adalah lebih besar dari (>) 100 dikalikan pengenceran tertinggi dan kalikan dengan luas cawan. Contoh dibawah berdasarkan pada penghitungan rata-rata 110/cm²

CONTOH:

pengenceran	:	1:100	1:1000	Perkiraan ALT koloni/mL atau koloni/g
Jumlah koloni	:	TBUD	7.150 ^a	> 6.500.000 ^b
		TBUD	6.490 ^c	> 5.900.000

- ^a berdasarkan luas area 65 cm²
- ^b perkiraan jumlah ALT
- ^c berdasarkan luas area 59 cm²

CATATAN Untuk perhitungan koloni yang menggunakan metode cawan agar sebar/*spread plate*, jumlah koloni yang dihitung dikalikan dengan 10 dari pengenceran yang digunakan.

11 Keamanan dan keselamatan kerja

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama melakukan pengujian maka perlu diperhatikan hal-hal sebagai berikut:

- a) cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan pengujian;
- b) gunakan jas laboratorium selama melakukan pengujian;
- c) lakukan setiap tahapan pengujian secara aseptis;
- d) bersihkan meja kerja sebelum dan sesudah melakukan pengujian;
- e) bersihkan segera contoh yang tercecer dan mengandung bakteri dengan menggunakan bahan desinfektan;
- f) media yang sudah digunakan disterilkan terlebih dahulu sebelum dibuang.



Lampiran A
(normatif)
Pembuatan media

A.1 Plate Count Agar

<i>Tryptone</i>	5	g
<i>Yeast extract</i>	22.5	g
<i>Dextrose</i>	1	g
<i>Agar</i>	15	g
<i>Aquades</i>	1	g

Panaskan seluruh bahan tersebut hingga mendidih. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C. Media tersedia secara komersial.

A.2 Peptone water

<i>Peptone water</i>	25,5	g
<i>Aquades</i>	1	L

Larutkan bahan dalam 1 liter aquades. Masukkan dalam wadah sesuai volume yang diinginkan. Sterilisasi dalam autoclave pada suhu 121 °C, selama 15 menit. pH akhir 7,0 ± 0,2.

A.3 Fluid thioglycolate medium

<i>Fluid thioglycolate medium</i>	30	g
<i>Aquades</i>	1	L

Larutkan bahan dalam 1 liter aquades. Dengan cara dipanaskan sampai mendidih atau dalam alat steam yang lain, tuang ke dalam tabung sterilisasi dalam autoclave pada suhu 121 °C, selama 15 menit. pH akhir 7,1 ± 0,2.

A.4 Fluid thioglycolate agar

<i>Fluid thioglycolate medium</i>	25,5	g
<i>Bacto agar</i>	15	g

Larutkan *Fluid thioglycolate medium* dalam 1 L aquades, tambahkan 15 g *Bacto agar*. Aduk sampai tercampur sempurna. Sterilisasi dalam autoclave pada suhu 121 °C, selama 15 menit.

Lampiran B
(normatif)
Pembuatan pereaksi

Larutan *Butterfield's phosphate buffered*

Larutan stok:

KH ₂ PO ₄	34	g
Aquades	500	mL

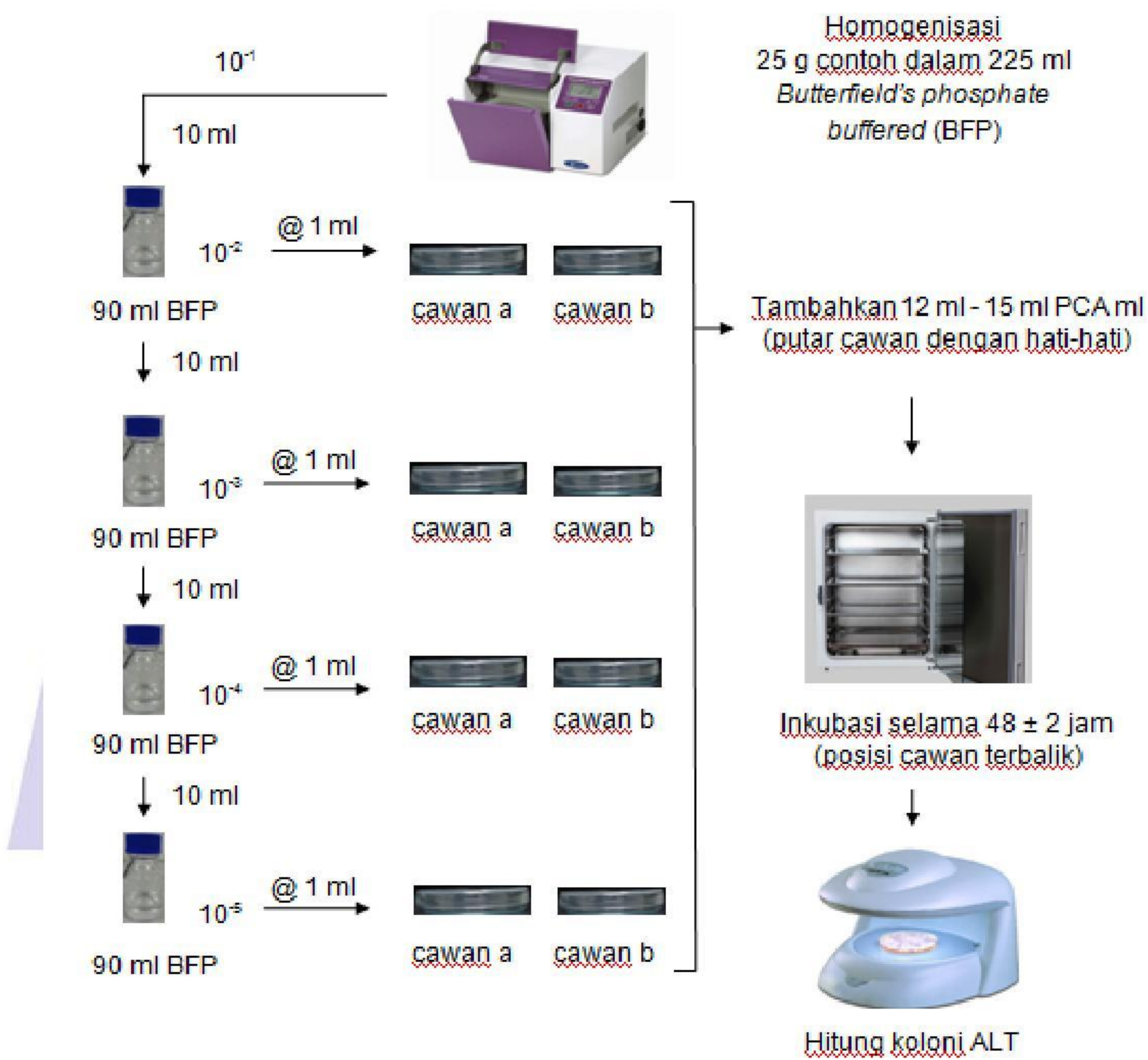
Atur pH 7.2 dengan 1 N NaOH. Tepatkan volume larutan tersebut hingga 1 liter dengan penambahan aquades. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C. Simpan dalam refrigerator.

Larutan kerja:

Pipet 10 mL larutan stok dan tepatkan hingga 1 L dengan penambahan aquades. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C.

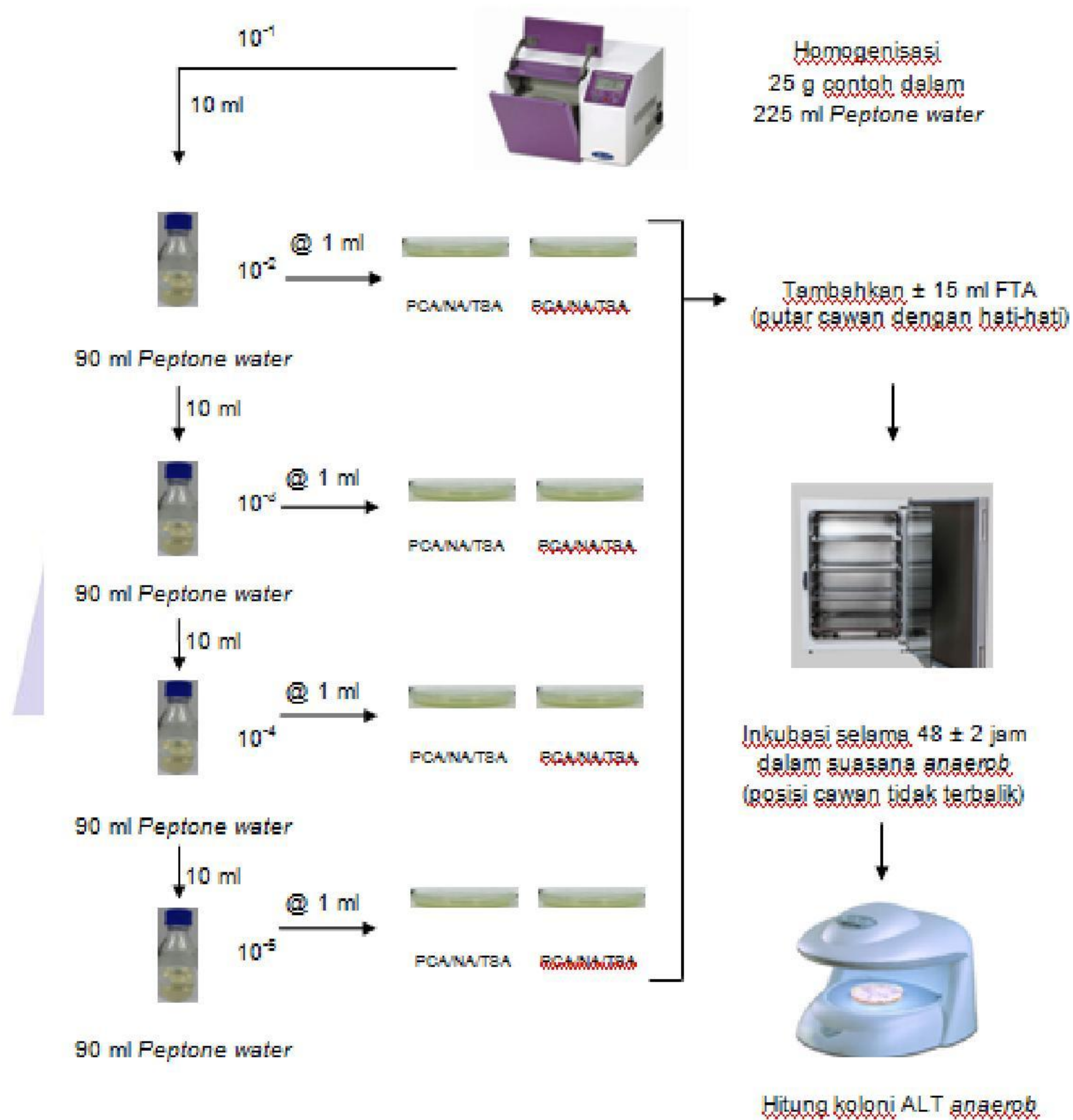


Lampiran C
(informatif)
Skema penentuan Angka Lempeng Total (ALT)



Gambar C.1 - Skema penentuan Angka Lempeng Total (ALT)

Lampiran D
(informatif)
Skema penentuan Angka Lempeng Total anaerob (ALT anaerob)



Gambar D.1 - Skema penentuan Angka Lempeng Total anaerob (ALT anaerob)

Bibliografi

Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. 8th edition, 2001. Chapter 3. AOAC International.

<http://www.fda.gov/food/foodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>
tanggal unduh 6/13/2014.

Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods (American Public Health Association Washington, D.C. 1984. Marvin L. Speck, Editor).

Data verifikasi metoda pengujian Angka Lempeng Total (ALT) aerob dan anaerob. Laboratorium mikrobiologi UPT BPMPHP DKI Jakarta, 2014.

